J. Fd Hyg. Safety 16(4), 264–273 (2001)

*Lactobacillus reuteri*의 주요 식품 위해 미생물에 대한 항균 효과

권남훈[1] · 김소현[1] · 배원기 · 김지연 · 임지연 · 노경민 · 김준만 · 안종삼* · 허진 · 박용호†
[1]공동기여저자, 서울대학교 농생명공학 사업단 수의대 미생물학교실, *국립 수의과학검역원

Antimicrobial Activity of *Lactobacillus reuteri* Against Major Food-Borne Pathogens

Nam Hoon Kwon[1], So Hyun Kim[1], W. K. Bae, J. Y. Kim, J. Y. Lim, K. M. Noh, J. M. Kim, J. S. Ahn*, J. Hur, and Y. H. Park†
[1]*Equally contributed, Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University*
National Veterinary Research and Quarantine Service

ABSTRACT – Antimicrobial activities of five different probiotics (*Lactobacillus reuteri, L. acidophillus, L. bulgaricus, L. casei and Bifidobacterium longum*) against 8 bacterial pathogens were determined on the Mueller Hinton Agar containing supernatant of probiotics obtained from 3 different growth conditions (MRS without glycerol, MRS with 0.5 M glycerol or 0.25 M glycerol solution). Though antimicrobial activity of *L. reuteri* in the first two conditions was not better than the others', the activity was significantly higher than that of others in 0.25 M glycerol solution. This prominent effect might be attributable to reuterin, produced by *L. reuteri* using glycerol. We could detect the presence of reuterin in the supernatant of 0.25 M glycerol solution with 500 MHz Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The result of minimum bactericidal concentration (dilution fold) has revealed that reuterin showed pan-bactericidal effects against 8 major food-borne pathogens. To examine any changes of antimicrobial activities of the probiotics, the probiotics were treated with different pH conditions, pepsin or trypsin digestion. Antimicrobial activity of reuterin was not entirely affected by any of these treatments, while the activities of the other probiotics were significantly decreased.

Key wards □ *Lactobacillus reuteri*, Reuterin, Probiotics, antimicrobial activity

Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes 그리고 *Escherichia coli* O157:H7 등은 주요한 식중독 원인균들로 이들에 의한 감염은 지속적으로 인류의 건강을 위협하고 있다[8,10,14,19,24,26]. 최근 식생활의 변화추세로 외식이 급증하였고 대량생산, 공급하는 업체가 늘어감에 따라 식중독의 위험은 이전보다 더 파급효과가 커지고 있는 실정이다. 한편, 식중독균을 비롯한 여러 유해균들을 control하려는 목적으로 항생제가 도처에서 지속적으로 사용되어 왔으며 그에 따른 오, 남용으로 인하여 항생제에 저항성을 획득한 수퍼박테리아들이 출현하기에 이르렀다[8,27]. 5가지의 항생제에 내성을 갖는 *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104, methicillin에 내성을 갖는 황색 포도상 구균 (MRSA), vancomycin 중간 내성의 황색포도상 구균 (VISA)[29] 등이 그 대표적인 예라고 할 수 있는데 내성균에 감염되면 더 이상 항생제로도 치료가 불가능해 짐에 따라 이러한 균들이 음식물에 유입되어 식생활을 위협할 경우 그 문제는 더욱 심각하다. 이러한 문제인식의 확산과 함께 항균, 항생제 사용에 대한 자제, 그리고 그 대안으로서 probiotics에 대한 관심이 증대되고 있다[7,8,11,16,21,27,29]. Probiotics란 미생물, 혹은 그들의 세포 구성 물질들로 다양한 기작을 통해 유해균들을 억제, 사멸시키고 면역능을 촉진시켜 숙주의 건강증진에 일익을 담당한다[16]. Probiotics 중에서도 *Lactobacillus, Bifidobacteria*는 사람과 온혈동물의 장관 내 복잡한 미세 환경속에서 중요한 역할을 담당하는 미생물들이며 이들에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[16]. 식품첨가물이나 치료용으로 이들 유산균들의 응용가능성은 무궁무진하며[16] 이미 밝혀진 몇 가지 기전들이 이러한 근거를 뒷받침하고 있다[4,5,6,13,17,28]. 이들은 숙주의 장관 내 면역적, 혹은 비 면역적 방어벽 형성을 촉진하고 유해균들의 부착을 차단한다[4,5,12]. 또한 유해균들을 억제하는 작용을 가진 대사 산물들, 즉, 유

†Author to whom correspondence should be addressed.

기산, 과산화수소, bacteriocins, deconjugated bile salts 등을 생산한다고 알려져 있다[6,13,30].

*L. reuteri*는 건강한 사람과 동물의 장관 내에 존재하는 *Lactobacillus*의 한 종으로서 glucose가 존재하지 않을 때 glycerol을 대사하여 강력한 항균물질인 reuterin을 생산하는 유일한 유산균이다[1,30]. Reuterin은 일종의 수용성 알데히드 저 분자물질이며 생리적인 온도와 pH 조건 하에서 생산된다[1]. *L. reuteri*에 의해 glycerol이 대사되면 1,3-propanediol, β-hydroxypropionic acid와 함께 reuterin이 생성되는데 reutrerin의 화학명은 β-hydroxypropionaldehyde으로 그 분자량은 148이고 수용액 상에서는 monomer, hydrated monomer, 그리고 cyclic dimer의 3가지 형태로 존재한다[30].

이 연구는 *L. reuteri*의 항균력을 probiotics로서 이용되어 온 다른 유산균들인 *L. bulgaricus, L. casei, L. acidophilus, B. longum*과 비교함과 동시에 식중독 유해균들에 대한 *L. reuteri*의 항균력을 검증해 보고자 하였다. 또한 probiotics로서 식품에 첨가되어 섭취될 경우 위나 장을 통과하면서 받을 영향들을 고려, pH 중화시험과 단백질 분해효소에 의한 항균력 변화여부를 검증하고자 하였다.

실험방법

공시균주

실험에 사용한 유산균은 다음과 같다.

Lactobacillus reuteri (CHR. HANSEN)

L. acidophilus (CHR. HANSEN)

L. bulgaricus (CHR. HANSEN)

L. casei (CHR. HANSEN)

Bifidobacterium longum (CHR. HANSEN)

5종 유산균들의 항균력 시험에 이용한 유해균들은 다음과 같다.

Staphylococcus aureus MNEV (exfoliative toxin A+)

S. aureus FRI 913 (SEA+, SEC+, SEE+ TSST-1+)

Listeria monocytogenes ATCC 11285

Salmonella enteritidis ATCC 13076

S. typhimurium

S. enteritica serova *Typhimurium* DT104 (ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides 그리고 tetracycline의 5가지 항생제에 내성인 균주)

Escherichia coli O157:H7 ATCC 43894 (SLTI+, SLTII+)

E. coli O157:H7 ATCC 43890 (SLTI+)

균주배양

5종 유산균들의 상층액을 얻기 위해 0.02 M의 glucose (Glu)를 첨가한 *Lactobacilli* MRS broth (MRS+Glu) (Difco, USA), 0.5 M glycerol (G)을 첨가한 *Lactobacilli* MRS broth (MRS+G) 그리고 0.25 M glycerol solution의 3가지 서로 다른 배양액을 사용하였다. MRS+Glu와 MRS +G에서는 37°C에서 24~48시간 동안 배양하였다. 0.25 M glycerol solution의 경우는 먼저 MRS+Glu에서 유산균들을 배양한 뒤 2,500 rpm, 30분간 원심 분리하여 침전된 pellet을 수거하였고 phosphate buffered saline (PBS)로 2번 세척한 뒤 0.25 M glycerol solution에 부유시켜 37°C, 6시간 동안 재배양하였다. 모든 유산균들은 호기 정치 배양하였으나 *B. longum*은 혐기 배양하였다. 모든 유산균들은 30 ml 배양액에서 배양하였고 균 pellet의 무게는 상층액 수거 후 측정 시 동일하게 2 g이 되도록 하였으며 각각의 3가지 조건에서 배양된 유산균들의 상층액은 2,500 rpm, 30 분간의 원심분리를 통해 얻었고 0.45 μm filter (Sartorius, Germany)로 여과멸균한 뒤 실험을 실시할 때까지 -20°C에 보관하였다.

8종의 유해균들은 tryptic soy broth (TSB) (Difco)에서 37°C, 24시간 동안 배양한 뒤 농도를 3.0×10^7 CFU/ml으로 하여 한천배지를 이용한 항균력 시험에 사용하였고, 1.0×10^6 CFU/ml 로 조정하여 생존균수 측정 시험에 사용하였다.

항균력 시험

1. 한천배지를 이용한 항균력 시험. 0.5, 1, 2, 3 ml (MRS +Glu, MRS+G) 또는 1, 2, 3, 4 ml (0.25 M glycerol solution)에서 배양한 각 유산균의 상층액을 Mueller Hinton Agar (Difco)와 잘 혼합하여 최종 10 ml가 되도록 한 뒤 petri dish에 부어 굳혔다. 그 다음 8종의 유해균들 (3.0×10^7 CFU/ml)을 굳은 배지 위에 inoculum replicator (최종 접종량: 3×10^4 CFU)로 접종 한 뒤 37°C에서 36시간 동안 배양하였다.

2. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)를 이용한 *L. reuteri* 상층액 분석. *L. reuteri*를 배양한 0.25 M glycerol solution의 상층액을 서울대학교 기초과학교육 공동연구원에 의뢰, 성분 분석을 시도하였다.

3. 생존균수측정시험, 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration (MIC)), 최소 사멸 농도 (minimum bactericidal concentration (MBC)). 한천배지를 이용한 항균력 시험결과 가장 항균력이 높았던 *L. bulgaricus, L. casei, L. reuteri*를 생존균수측정시험과 최소억제농도 (MIC), 최소사멸농도 (MBC) 측정에 이용하였다. 각 유산균의 최대 항균력 발휘조건 하에서 비교하기 위해 *L. bulgaricus, L. casei*는 MRS+Glu에서 배양을 하였고 *L. reuteri*는 0.25 M glycerol solution에서 배양하여 얻은 상층액을 사용하였다. 3가지 유산균 (*L. reuteri, L. bulgaricus, L. casei*)의 상층액 0.5, 1, 2,

3, 4 ml를 Mueller Hinton Broth (MHB) (Difco)와 혼합하여 최종 10 ml가 되도록 하였다. 8종의 유해균들을 각 유산균의 상층액이 농도별로 첨가된 시험관에 1.0×10^6 CFU/ml의 농도로 접종하였다. 각 시험관들을 37℃에서 36시간 동안 배양한 뒤 균의 성장이 관찰되지 않은 상층액의 최소농도를 MIC로 하였고 균이 성장하지 않은 배양액을 5% 혈액한천배지 (KOMED, Korea)로 옮겨 재 배양한 뒤 여기서도 균의 성장이 관찰되지 않은 최소 농도를 MBC로 하였다.

8가지 균이 접종 된 시험관 중 *S. aureus* FRI 913, *S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104, *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *L. monocytogenes* ATCC 11285의 4종 균을 선택하여 시간 경과에 따른 항균효과를 알아보기 위해 생존균수 측정을 하였다. 각 균수 측정을 2시간, 36시간 경과 시에 각각 실시하였다.

4. pH 적정과 pepsin 또는 trypsin 처리에 따른 항균력 변화 시험. 항균력 시험 3과 동일한 방법으로 얻은 3가지 유산균 (*L. bulgaricus, L. casei, L. reuteri*)의 상층액을 각각 4군으로 나누었다. 한 군은 1 N NaOH 용액을 첨가하여 pH 7.3으로 조정, pH의 변화에 따른 항균력의 변화를 관찰하였고, 다른 두 군은 효소처리에 따른 항균력 변화를 보기 위해 각각 pepsin 처리군, trypsin 처리군으로 하였고 나머지 한 군은 대조군으로 하였다. Pepsin 처리군과 trypsin 처리군은 각각의 pH를 2.0, 7.3으로 조정한 뒤 20 unit/ml-pepsinogen (Sigma, USA)과 1 ml trypsin-EDTA (Sigma, USA)를 각

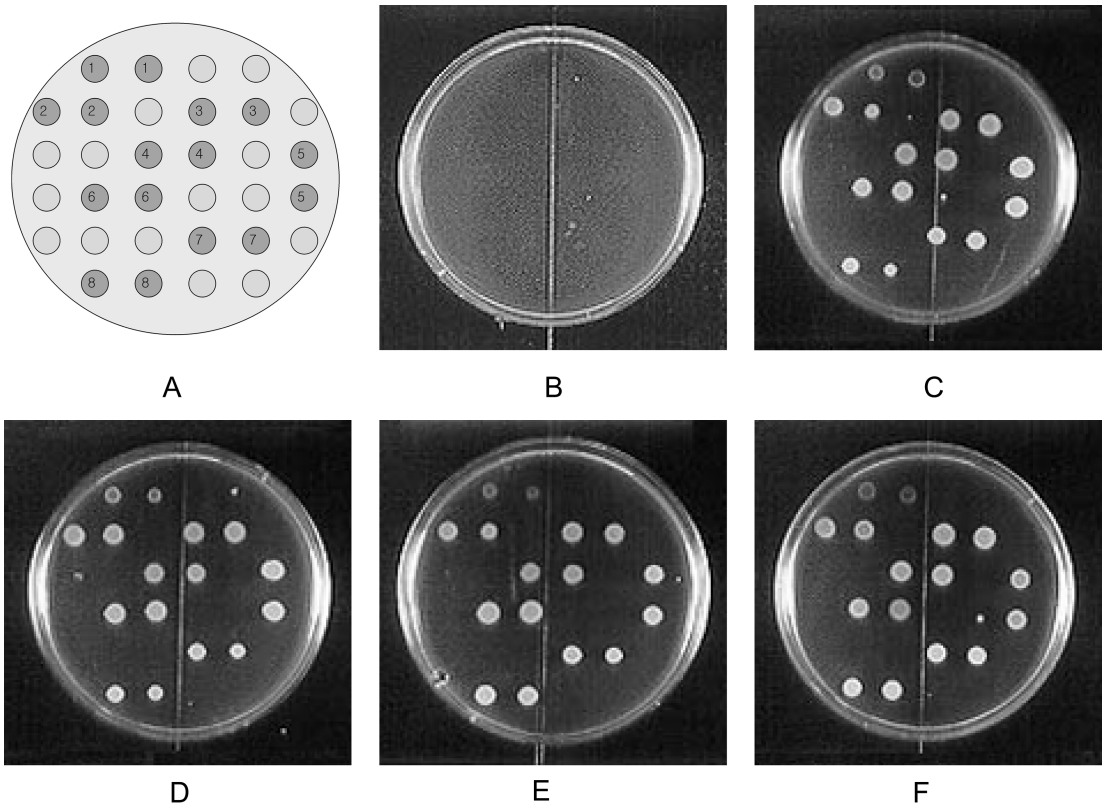

Fig. 1. Comparison of antimicrobial activities of 5 probiotics in agar method.
A: Each number indicated a bacterial inoculation of eight food-borne pathogens.
1. *Listeria monocytogenes* ATCC 11285; 2. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076; 3. *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43890; 4. *E. coli* O157:H7 ATCC 43894; 5. *S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104; 6. *S. typhimurium*; 7. *Staphylococcus aureus* MNEV; 8. *S. aureus* FRI 913
B: 1 ml supernatant of *Lactobacillus reuteri*; C: 4 ml supernatant of *L. acidophillus*; D: 4 ml supernatant of *L. bulgaricus*; E: 4 ml supernatant of *L. casei*; F: 4 ml supernatant of *Bifidobacterium longum*
All probiotics were incubated in 0.25 M glycerol solution before supernatants were collected. As figure showed, growth of every pathogen was inhibited by 1 ml supernatant of *L. reuteri*. But, supernatants of the other probiotics were not able to suppress the growth of 8 pathogens even when 4 ml supernatants were applied.

각 첨가하였다. 두 군은 2시간 동안 37°C에서 반응시켰고 이후 pH 농도를 5.0으로 조정하여 효소의 작용을 불활화 하였다. 대조군의 pH는 5.0으로 조정하여 효소 처리 이외의 다른 영향에 의한 항균력 변화 가능성을 없애고자 하였다.

pH 조정 후 상층액을 filter로 여과 멸균하였고 이후 한천배지를 이용한 항균력 시험과 같은 과정을 거쳤다. 각 유해균의 최종 접종 농도는 3.0×10^4 CFU였으며 37°C에서 36시간 동안 배양하였다.

5. 통계처리. 윈도우용 SAS V8의 코크랜 Q 검정 (Cochran Q test)과 프리드만 순위에 의한 이원분산분석법 (Fredman two-way ANOVA by ranks)으로 자료를 분석, 통계처리를 하였다.

결 과

한천배지를 이용한 항균력 시험: 유산균 배양 조건 세 가지 중 MRS+Glu broth를 이용한 항균력 시험 결과, *L. bulgaricus*를 제외한 4종의 유산균들의 상층액 0.5 ml 첨가는 유해균들의 성장을 억제하지 못하였다. *L. bulgaricus*의 경우도 *L. monocytogenes*만을 억제하였다. *L. reuteri, L. acidophilus, B. longum*의 상층액을 각각 1 ml 첨가한 경우 역시 유해균들의 성장을 억제하지 못하였다. 그러나 *L. bulgaricus*, *L. casei*의 상층액 1 ml는 8종의 모든 유해균들을 효과적으로 억제하였다. 2 ml 및 3 ml 상층액 첨가 시엔 모든 유산균이 유해균들에 대해 항균력을 보였다. 이상의 결과로 볼 때, MRS+Glu broth를 이용한 5종 유산균들의 항균력 시험에서는 *L. bulgricus*와 *L. casei*의 항균능이 다른 유산균보다 우수하게 관찰되었다.

다음으로 MRS+G에서 배양하여 얻은 상층액의 항균력 시험 결과는 MRS+Glu broth를 이용한 경우와 유사하게 나타났다. 그러나 *B. longum*의 상층액 1 ml 첨가 시 *S. aureus*를 제외한 모든 유해균들의 성장이 억제되었고, *L. reuteri*의 상층액 1 ml 첨가 시는 MRS+Glu broth에서의 실험결과보다 유해균들의 성장이 미약하였다. 결과적으로 배양 조건에서의 항균력 시험 역시 *L. bulgaricus*와 *L. casei*가 가장 우수한 항균능력을 보였다.

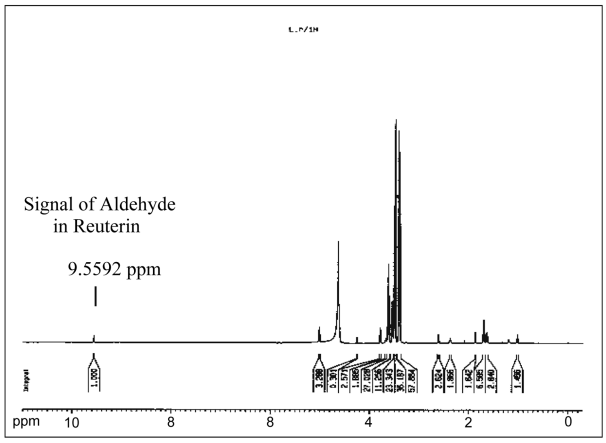

Fig. 2. Proton NMR spectroscopy of *Lactobacillus reuteri* supernatant.

반면 0.25 M glycerol solution을 이용한 항균력 시험[9]에서는 *L reuteri*가 탁월한 비교우위의 항균력을 지니고 있음을 관찰할 수 있었고 (Fig. 1) 통계적으로도 유의하였다 ($p < 0.05$). *L. reteuri*의 상층액은 첨가된 모든 농도 (1, 2, 3, 4 ml)에서 유해균들의 성장을 효과적으로 억제하였다. 그러나 이 조건 하에서 다른 유산균들은 전혀 항균력을 나타내지 않았다.

Table 1. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of *Lactobacillus reuteri*, *L. bulgaricus* and *L. casei*.

Pathogens	MIC and MBC (dilution fold)*		
	L. reuteri[a]	*L. bulgaricus*[b]	*L. casei*[b]
Salmonella[c]	10	2.5	5
E. coli O157:H7[d]	10	2.5	5
S. aureus[e]	10	2.5	5
L. monocytogenes	5	2.5	5

Each probiotic was incubated at concentration of 2 g/30 ml and then its supernatant was collected. Concentration of each supernatant was adjusted to 1.0×10^6 CFU/ml.

*: Antimicrobial activity of each probiotic was intended to be compared with on the basis of same bacterial concentration, so OD value of each supernatant was not calculated.

a: Its supernatant was obtained from 0.25 M glycerol solution.

b: Their supernatant were obtained from MRS broth containing 0.02 M glucose without glycerol.

c: *Salmonella* used in this study were *S. typhimurium, S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104 and *S. enteritidis* ATCC 13076.

d: *Escherichia coli* O157:H7 used in this study were *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 and *E. coli* O157:H7 ATCC 43890.

e: *Staphylococcus aureus* used in this study were *S. aureus* MNEV and *S. aureus* FRI 913.

0.25 M glycerol solution에서 나타난 탁월한 *L. reuteri*의 항균력은, *L. reueri*가 glycerol을 이용하여 생산하는 reuterin이란 항균물질 때문으로 여겨졌으므로 이 상층액을 서울대학교 기초과학교육 공동연구원에 분석을 의뢰하였다. 500 MHz NMR을 이용, proton 분석을 하였으며 그 결과 알데히드기 (-HC=O)를 가진 reuterin을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

생존균수측정시험, 최소억제농도 (MIC), **최소사멸농도** (MBC): 한천배지를 이용한 세 가지 조건의 항균력 시험 결과에서 가장 높은 효능을 보였던 *L. reuteri L. bulgaricus*, *L. casei*에 대해 MIC와 MBC를 측정하기 위한 실험을 수행하였다. 앞서의 실험한 세 가지 배양 조건 중 각 유산균이 각자 최적의 항균력을 나타낸 조건으로 배양하여 그 상층액을 사용하되, 유산균의 농도는 동일하게 조정하여 수행한 결과 *L. reuteri*가 가장 월등한 항균력을 가짐을 확인하였다 (Table 1). 4가지 주요 유해균에 대한 시간에 따른 생존균수 측정시험을 수행한 결과 역시 *L. reuteri*의 항균효능이 가장 높게 나타났다 (Fig. 3).

pH 조정, pepsin 또는 trypsin 처리에 따른 항균력 변화 시험: pH 조정에 따른 3가지 주요 유산균의 항균력 변화여부는 Table 2에 기술하였다. 이 결과에서 알 수 있듯이, *L. bulgaricus*와 *L. casei*의 항균력은 pH에 매우 의존적임이 관찰되었다. 그러나 *L. reuteri*의 상층액, 즉 reuterin의 항균력은 산의 중화에 의해 아무런 영향을 받지 않았으며 통계적으로도 유의하였다 ($p<0.05$).

Pepsin이나 trypsin으로 단백질을 가수분해한 뒤 항균력의 변화를 살펴본 결과, reuterin의 항균력에는 아무런 변화가 없었다 (Table 3, 4). 반면 *L. bularicus*와 *L. casei*의 항균력은 다소 감소된 결과를 나타내었다. *L. bulgaricus*의 경우, *Salmonella typhimurium, E. coli* O157:H7 (ATCC 43894, ATCC 43890), *S. aureus* (FRI 913, MNEV) 그리고 *L. monocytogenes*

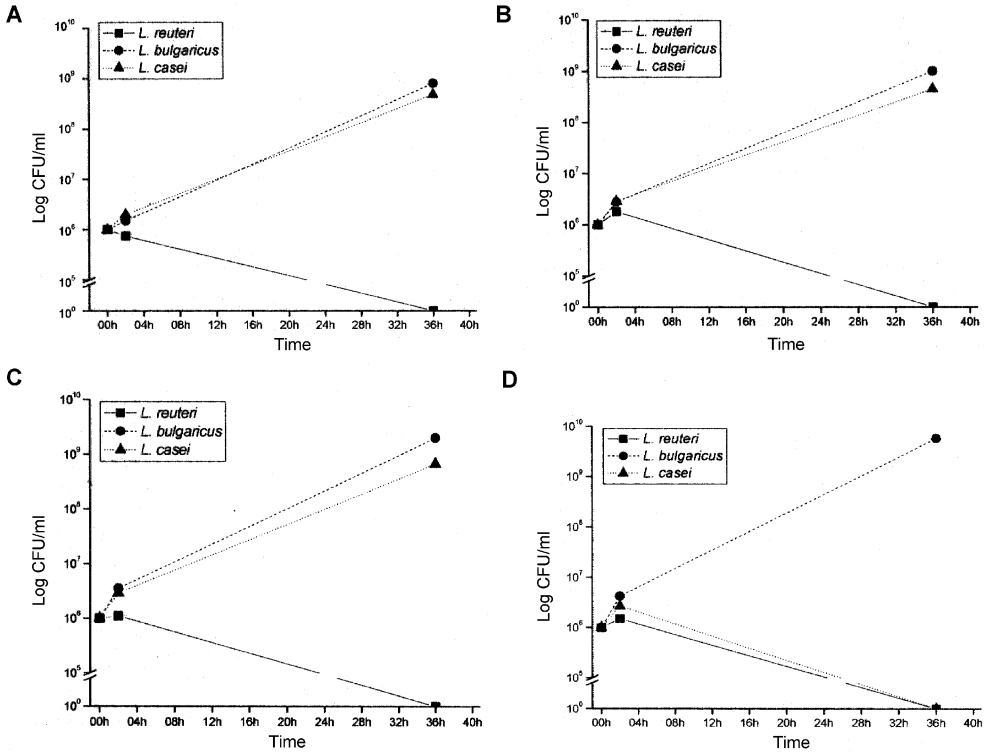

Fig. 3. Viable count graph of four major food-borne pathogens incubated with supernatant of 3 probiotics.
A: Viable count graph of *Salmonella enteritica* serovar *Typhimurium* DT104 (with 1 ml supernatant added); B: Viable count graph of *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894 (with 1 ml supernatant added); C: Viable count graph of *Staphylococcus aureus* (with 1 ml supernatant added); D: Viable count graph of *Listeria monocytogenes* ATCC 11285 (with 2 ml supernatant added). Supernatant of *L. reuteri* was collected from 0.25 M glycerol solution.
Three pathogens, *S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104, *S. aureus* and *E. coli* O157:H7 didn't survived 1 ml supernatant of *L. reuteri*. *L. monocytogenes* could grow in the broth containing 1 ml supernatant of *L. reuteri* though 2 ml supernatant of *L. reuteri* showed bactericidal effect on it.

Table 2. Influence of pH adjustments on antimicrobial activities of 3 probiotics.

Probiotics	pH	Supernatant volume[a]	*Salmonella*[d]	*E. coli* O157:H7[e]	*S. aureus* FRI913	*S. aureus* MNEV	*Listeria monocytogenes*
L. reuteri[b]	pH 5.0 (Control)	1	+	+	+	+	+
		2	-	-	-	-	±
		3	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-
	pH 7.3	1	+	+	+	+	+
		2	-	-	-	-	±
		3	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-
L. bulgari*cus*[c]	pH 5.0 (Control)	1	+	+	+	+	+
		2	+	+	+	+	-
		3	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-
	pH 7.3	all volume	all positive				
L.casei[c]	pH 5.0 (Control)	1 ml	+	+	+	+	+
		2 ml	+	+	+	+	+
		3 ml	-	-	+	-	-
		4 ml	-	-	-	-	-
	pH 7.3	all volume	all positive				

+: Growth
±: Weak growth
-: No growth
a: The volume of supernatants added in MHB (total 10 ml).
b: Its supernatant was obtained from 0.25 M glycerol solution.
c: Their supernatants were obtained from MRS broth containing 0.02 M glucose without glycerol.
d: *Salmonella* used in this study were *S. typhimurium, S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104 and *S. enteritidis* ATCC 13076.
e: *E. coli* O157:H7 used in this study were two strains; *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 and *E. coli* O157:H7 ATCC 43890.

Table 3. Change of antimicrobial activity of *Lactobacillus reuteri* after pepsin or trypsin treatment

Enzyme	Supernatant volume[a]	*Salmonella*[b]	*E. coli* O157:H7[c]	*S. aureus* FRI913	*S. aureus* MNEV	*Listeria monocytogenes*
No treatment (Control)	1 ml	+	+	+	+	+
	2 ml	-	-	-	-	+
	3 ml	-	-	-	-	-
Pepsin	1 ml	+	+	+	+	+
	2 ml	-	-	-	-	+
	3 ml	-	-	-	-	-
Trypsin	1 ml	+	+	+	+	+
	2 ml	-	-	-	-	+
	3 ml	-	-	-	-	-

Supernatant of *L. reuteri* was obtained from 0.25 M glycerol solution.
+: Growth
-: No growth
a: The volume of supernatants added in MHB (total 10 ml).
b: *Salmonella* used in this study were *S. typhimurium, S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104 and *S. enteritidis* ATCC 13076.
c: *E. coli* O157:H7 used in this study were two strains; *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 and *E. coli* O157:H7 ATCC 43890.

Table 4. Change of antimicrobial activities of *Lactobacillus bulgaricus* and *L. casei* after pepsin or trypsin treatment.

Probiotics	Enzyme	Supernatant volume[a]	*Salmonella*[b]	*E. coli* O157:H7[c]	*S. aureus* FRI913	*S.aureus* MNEV	*Listeria monocytogenes*
L. bulgaricus	No treatment (Control)	2	+	+	+	+	-
		3	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-
	Pepsin	2	+	+	+	+	+
		3	+[1]	+	+	+	-
		4	-	-	-	-	-
	Trypsin	2	+	+	+	+	+
		3	-	+[2]	+	+	-
		4	-	-	-	-	-
L.casei	No treatment (Control)	2	+	+	+	+	+
		3	-	-	+	-	-
		4	-	-	-	-	-
	Pepsin	2	+	+	+	+	+
		3	-	+[2]	+	+	-
		4	-	-	-	-	-
	Trypsin	2	+	+	+	+	+
		3	-	-	+	+	-
		4	-	-	-	-	-

Supernatants of *L. bulgaricus* and *L. casei* were obtained from MRS broth containing 0.02 M glucose without glycerol.
+: Growth
-: No growth
1: *S. typhimurium* grew only.
2: *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 grew only.
a: The volume of supernatants added in MHB (total 10 ml).
b: *Salmonella* used in this study were *S. typhimurium, S. enteritica* serova *Typhimurium* DT104 and *S. enteritidis* ATCC 13076.
c: *E. coli* O157:H7 used in this study were two strains; *E. coli* O157:H7 ATCC 43894 and *E. coli* O157:H7 ATCC 43890.

ATCC 11285에 대한 항균 효능이 사라졌으며 ($P<0.05$) 마찬가지로 *L. casei*도 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *S. aureus* MNEV에 대해 항균력이 사라진 결과를 나타내었다.

고 찰

본 연구에서는 주요 식품 위해 미생물에 대한 *L. reuteri*의 항균력을 다른 4종의 유산균들인 *L. bulgaricus, L. casei, L. acidophilus, B. longum*과 서로 다른 배양 조건하에서 비교해 보았다. 이는 *L. reuteri*의 주요 식품 위해 미생물에 대한 항균력을 확인함과 동시에, 각각 그 효능이 입증되어 probiotics로서 활용되고 있는 주요 유산균들의 항균력을 객관적으로 비교, 검증해 보기 위한 것이다.

MRS broth에 0.02 M Glucose를 첨가시켜 유산균들을 배양, 그 상층액을 수거해 항균력을 시험해 본 결과, *L. bulgaricus*와 *L. casei*가 *L. reuteri*보다 우수한 유해균 억제능을 보였다. 이는 MRS+0.5 M glycerol을 이용한 경우도 동일하였다. *L. reuteri*는 reuterin이라는 bacteriocin 유사물질을 산생하는데 이 물질은 *L. reuteri*가 glycerol을 이용하여 생산한다고 알려져 있다[9]. 이에 본 실험에서는 MRS broth에 glycerol을 첨가해 실험을 수행해 본 것이었으나 *L. reuteri*의 높은 항균력을 관찰할 수는 없었다. 이는 MRS+0.5 M glycerol broth에서는 유해균들을 효과적으로 억제할 만큼의 충분한 reuterin이 생산되기엔 부적절하기 때문인 것으로 생각된다. 그 이유는 reuterin은 중성조건에서 생산되는 물질인데 MRS +0.5 M glycerol 배양액의 pH는 4.0 이하의 값을 나타내었고 MRS broth 자체가 이미 약산성이기 때문이다. 그럼에도 MRS+Glu solution에서의 결과보다 다소 항균력의 상승이 관찰되었으므로 MRS+0.5 M glycerol 상층액에는 소량의 reuterin이 존재하는 것으로 사료된다.

Reuterin의 생성을 촉진시키기 위해 앞서 기술한 바와 같이 MRS+Glu broth에서 배양한 후 0.25 M glycerol solution에서 재 배양하여 상층액을 수거하는 방법을 이용한 결과, *L. reuteri*의 높은 항균력을 검증할 수 있었다. 0.25 M glycerol solution은 중성이므로 이 배지에서 reuterin의 생산은 안정적인 것으로 생각된다. 실험에 이용된, *L. reuteri*를

포함한 모든 유산균들은 0.25 M glycerol solution에서 6 시간 배양한 결과 pH 4.0 이하의 산성을 나타내었다. 그러나 이 조건에서 다른 유산균들이 항균력을 전혀 갖지 못한 것으로 보아 이때 생산되는 산은 항균력과는 무관한 것으로 판단했으며, 또한 0.25 M glycerol solution에서의 *L. reuteri*의 탁월한 항균력은 reuterin에 기인한 결과로 볼 수 있었다. 또 하나의 확실한 근거는 0.25 M glycerol solution에서 배양한 *L. reuteri*의 상층액을 NMR로 분석한 결과, reuterin이 지니는 알데히드기 등 특유의 구조를 말해주는 peak를 확인했다는 점이다.

생존균수측정시험과 MIC, MBC 결과 역시 *L. reuteri*가 광범위 항균능을 지녔음을 확인하도록 해 주었다. *L. monocytogenes*에 대한 reuterin의 MIC, MBC (희석배수로 표시하였음)는 다른 유해균들에 비해 2배 낮은 희석배수로 나타났는데, 이로 보아 *L. monocytogenes*는 다른 유해균들에 비해 비교적 reuterin에 대한 저항성이 있는 것으로 생각된다. 한편, 한천배지를 이용한 항균력 시험에서 가장 높은 효능을 나타내었던 *L. bulgaricus*는 MIC와 MBC 측정 결과 *L. casei*보다 낮은 항균능을 보였다. 이로 보아 *L. bulgaricus*가 *L. casei*에 비해 억제능은 우수하나 사멸능력은 부족함을 알 수 있었다.

이와 같은 실험결과들을 통해, *L. reuteri*가 매우 탁월한 항균효능을 지녔음을 알 수 있었고 다른 유산균들에 비해 probiotics로서 비교우위를 점하고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 유산균들이 장관을 통과할 때 장내 중성의 pH나 단백질 분해효소들에 의해 그 효능이 감소되지 않아야만 그 항균효능을 온전히 발휘할 수 있다. 이에 pH 적정과 단백질 분해 효소처리 후 항균력 변화 시험을 실시하였고 그 결과 reuterin의 항균력은 이러한 처리들에 의해 아무런 변화를 나타내지 않은 반면 *L. bulgaricus*와 *L. casei*는 항균력의 감소를 나타내었고, 특히 pH 변화의 영향을 많이 받음을 알 수 있었다. Reuterin은 알데히드이므로 단백질분해 효소나 pH의 영향을 받지 않은 것은 예상된 결과였고 따라서 항균물질로서 산이나 단백질성의 bacteriocin에 의존하는 다른 유산균들에 비해 생체 내 환경에서도 항균력을 보존할 수 있다는 장점을 갖는 것으로 생각된다. *L. bulgaricus*와 *L. casei*의 단백질 분해 효소 처리결과를 살펴보면 3 ml 첨가 시에 항균력 감소 효과가 가장 명확하게 드러났다. 반면 4 ml 첨가 시는 대조군과 동일하게 나타났는데 이는 산의 영향 때문인 것으로 생각된다. 즉 4 ml 첨가 조건은 단백질성 항균물질의 불활화 영향보다 다량으로 존재하는 산에 의해 항균력이 나타나 대조군과 차이가 없는 결과를 보인 것이다.

*L. bulgaricus*는 bacteriocin을 생성하기는 하지만 드물며[23] *L. acidophillus*는 lactacin B, acidocin B 등의 광범위 bacteriocin을 생산한다[220]. *L. casei*는 lactocidin 705라는 bacetriocin을 분비하는 것으로 알려져 있다[32]. *L. reuteri*도 reutericidin 6이라는 bacteriocin을 분비하는 것으로 알려져 있는데[31] 이와 다른 연구결과에서는 bacteriocin을 검출하지 못한 경우로 보아[25] 배양조건이나 *L. reuteri* strain에 따라 차이가 있는 것으로 보인다. 본 실험에서도 결과로 제시하지는 않았으나 *L. reuteri*의 MRS+G 상층액에 대해 단백질 분해효소 처리를 해 본 결과 어느 정도 항균력 감소가 관찰되었다. 이는 본 실험에 이용한 strain도 bacteriocin을 분비할 가능성을 시사해 주는 것이라고 할 수 있다. *L. reuteri*는 bacteriocin과 reuterin 이외에도 reutericyclin이라는 항균물질을 생산한다[22]. 그런데 이 물질은 그람 양성 세균에 대해서는 광범위 항균력을 가지지만 그람 음성 세균에 대해서는 항균력을 갖지 않는다. 그러나 이 연구에서는 그람 음성 세균들인 *Salmonella, E. coli*에 대해서도 그람 양성균과 동일한 항균력을 나타내었다. 따라서 이와 같은 결과들을 종합해 보면 주요 유산균들 중에서 *L. reuteri*의 항균력이 가장 우수하면서 광범위하고 또한 *L. reuteri*가 분비하는 항균물질인 산, reuterin, reutericyclin, reutericidin 6 중에서 reuterin이 가장 강력하면서도 인체나 동물 장관에서 가장 높은 효력을 가진다고 판단할 수 있다.

*L. reuteri*는 glucose가 존재하지 않을 때 glycerol을 이용하여 reuterin을 생성한다. Glycerol이 대사되면 1,3-propanediol, β-hydroxypropionic acid와 함께 reuterin이 생성되는데 reutrerin의 화학명은 β-hydroxypropionaldehyde으로 그 분자량은 148이고 수용액 상에서는 monomer, hydrated monomer, 그리고 cyclic dimer의 3가지 형태로 존재한다[30]. 돼지를 이용한 생체실험 결과에 따르면 *L. reuteri*는 다른 유산균들보다도 강하게 위의 산성 환경을 견뎌 내어 장에 정착하며 장기간 생존, 장 내 환경에서 reuterin을 생성한다[9]. 또한 인체 장 세포주인 Caco-2 세포를 이용한 실험결과에 의하면 *L. reuteri*는 다른 유산균들보다도 강하게 사람 장 세포에 부착하는 능력을 가지고 있음이 밝혀진 바 있다[18]. Reuterin은 DNA 합성 과정의 첫 단계에 관여하는 ribonucleotide reductase를 억제하여 그 효력을 발휘하는데 세균뿐만이 아니라 바이러스, protozoa, 곰팡이, 심지어 암세포까지 억제하는 능력을 지니고 있다[9]. 그러면서도 *L. reuteri*는 장내 정상 세균총을 이루는 세균들에는 항균력을 나타내지 않는다는 연구결과가 있어 가히 probiotics로서 지닐 수 있는 최대의 장점을 보유하고 있다 할 것이다[18].

Reuterin 생성의 근본이 되는 glycerol은 음식물과 동물의 사료에 존재하는 지방성분이 장내에서 분해되면 부족함이 없이 생산되므로 별도의 공급이 필요 없다.

*L. reuteri*는 모유에서도 분리되는 유산균으로 아기들이 모유 수유를 받는 기간에는 어른보다 *L. reuteri* 장내 보유도가

높지만 성장함에 따라 그 보유도가 줄어들게 된다. 그러므로 *L. reuteri*를 probiotics로서 이용, 유아들뿐만이 아니라 성인들에게 공급할 경우 매우 효과를 볼 것으로 기대되며 *L. reuteri* 특히 reuterin의 응용분야와 그 가능성은 매우 높다고 생각된다.

감사의 말씀

NMR 분석과 해석에 도움을 주신 서울대학교 기초과학교육 공동연구원과 서울대 자연대 화학과 석사과정 박기현 님, 그리고 실험과정에 도움을 준 서울대 수의대 실험동물학교실 박사과정 박종환 님께 지면을 통해 감사의 뜻을 전합니다.

국문요약

본 연구에서는 5종의 유산균들 (*Lactobacillus reuteri, L. acidophillus, L. bulgaricus, L. casei* and *Bifidobacterium longum*)의 식중독 균들에 대한 항균력을 조사하였다. 각 유산균들을 3가지 서로 다른 조건 (MRS+glucose, MRS+0.5 M glycerol, 0.25 M glycerol solution)에서 배양한 후 그 상층액이 포함된 Meuller Hinton Agar에 8종의 유해균들을 접종하였다. MRS+glucose, MRS+0.5 M glycerol에서의 상층액을 이용한 실험에서는 *L. reuteri*의 항균력이 다른 유산균들에 비해 높지 않았으나 0.25 M glycerol solution에서는 탁월하게 높은 결과를 나타내었다 ($p<0.05$). 0.25 M glycerol solution에서 나타난 높은 항균력은 *L. reuteri*가 glycerol을 이용하여 생산하는 reuterin이란 물질 때문이라 생각되며, 0.25 M glycerol solution의 상층액을 500 MHz Nuclear Magnetic Resonance (NMR)를 통해 분석한 결과 reuterin의 존재를 확인할 수 있었다. 3가지 조건 하에서의 항균력 시험 결과 가장 높은 항균력을 나타낸 3가지 유산균들 (*Lactobacillus reuteri, L. bulgaricus, L. casei*)을 선발, 각각 최고의 항균력을 나타낸 조건으로 배양하여 최소사멸농도 (minimum bactericidal concentration)를 측정한 결과, *L. reuteri*가 생산한 reuterin이 광범위 항균물질임을 확인하였다. 또한 pH 적정, pepsin 혹은 trypsin 처리를 한 후 3가지 유산균들의 항균력 변화를 조사한 결과 *L. bulgaricus*와 *L. casei*의 항균력은 이러한 조건에서 상당히 감소한 반면 reuterin의 항균력은 아무런 영향을 받지 않았다 ($p<0.05$). 이상의 결과들로 보아 주요 유산균들 중에서 *L. reuteri*의 항균력이 가장 우수하면서 광범위하였으며 이는 *L. reuteri*가 분비하는 항균물질인 reuterin에 기인한 것으로 사료된다. 또한 reuterin의 항균력은 타 유산균과는 달리 장관내 pH나 단백질 분해효소에 의해 영향을 받지 않으므로 인체나 동물 장관에서 가장 높은 효력을 가진다고 판단할 수 있다.

참고문헌

1. Axelsson, L., and S. E. Lindgren: Characterization and DNA homology of *Lactobaillus* strain isolated from pig intestine. *J. Appl. Bacteriol.*, **62**, 433-440 (1987).
2. Barefoot S. F., Klaenkammer T. R.: Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ Microbiol.*, **45(6)**, 1808-1815 (1983).
3. Barefoot S. F., Klaenkammer T. R.: Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **26(3)**, 328-334 (1984).
4. Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin: Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ.Microbiol.*, **59**, 4121-4128 (1993).
5. Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin: *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, **35**, 483-489 (1994).
6. Bernet-Camard, M. F., V. Lievin, D. Brassart, J. R. Neeser, A. L. Servin, and S. Hudault: The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 2747-2753 (1997).
7. Brassart, D., and E. J. Schiffrin: The use of probiotics to reinforce mucosal defence mechanisms. *Trends Food Sci. & Technol.*, **8**, 321-326 (1997).
8. Carlson, S. A., R. M. Willson, A. J. Crane, and K. E. Ferris: Evaluation of invasion-conferring genotypes and antibiotic-induced hyperinvasive phenotypes in multiple antibiotic resistant *Salmonella typhimurium* DT104. *Microb. Pathog.*, **28**, 373-378 (2000).
9. Dobrogosz W. J., Raleigh N. C., and Sven E. Lindgren: Method for inhibiting microorganism growth, US patent 5, 849, 289. 1998 Dec 15.

10. Duffy, L. L., F. H. Grau, and P. B. Vanderlinde: Acid resistance of enterohaemorrhagic and generic *Escherichia coli*associated with food-borne disease and meat. *Int. J. Food Microbiol*., **60**, 83-89 (2000).
11. Dugas, B., A. Mercenier, I. Lenoir-Wijnkoop, C. Arnaud, N. Dugas, and E. Postaire: Immunity and probiotics. *Immunol. Today,* **20**, 387-390 (1999).
12. Fang, H., T. Elina, A. Heikki, and S. Seppo: Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*., **29**, 47-52 (2000).
13. Fujiwara, S., H. Hashiba, T. Hirota, and J. F. Forstner: Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. *Appl. Environ. Microbiol*., **63**, 506-512 (1997).
14. Glass, K. A, K. M. Kaufman, and E. A. Johnson: Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30 degrees C. *J. Food Prot*., **61**, 290-294 (1998).
15. Gomes, A. M. P., and F. X. Malcata: *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. & Technol*., **10**, 139-157 (1999).
16. Guarner, F., and G. J. Schaafsma: Probiotics. *Int. J. Food Microbiol*., **39**, 237-238 (1998).
17. Hudault, S., V. Lievin, M. F. Bernet-Camard, and A. L. Servin: Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Appl. Environ. Microbiol*., **63**, 513-518 (1997).
18. Jacobsen C. N., Nielsen V. R. et al.: Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol*., **65**, 4949-4956 (1999).
19. Karch, H., M. Bielaszewska, M. Bitzan, and H. Schmidt: Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*., **34**, 229-243 (1999).
20. Leer R. J., Van der Vossen J. M., et al.: Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*, **141(pt7)**, 1629-1635 (1995).
21. Marcon, M. J: Probiotics in health and medicine: Moving from fashion to scientific validity. *CMNEEJ*., **19**, 89-96 (1997).
22. Michael G. G., Alexandra H. et al.: Characterization of Reutericyclin Produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl. Env. Microbiol*., **66**, 4325-4333 (2000).
23. Miteva V., Stefanova T., et al.: Characterization of bacteriocins produced by strains from traditional Bulgarican dairy products. *Syst. Appl. Microbiol*., **21**, 151-161 (1998).
24. Olsen, S. J., R. Bishop, F. W. Brenner, T. H. Roels, N. Bean, R. V. Tauxe, and L. Slutsker: The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *J. Infect. Dis*., **183**, 753-761 (2001).
25. Sanni A. I., Onilude A. A., Ogunbanwo S. T. and Smith S. I.: Antagonistic activity of Bacteriocin produced by *Lactobacillus* species from ogi, an indigenous fermented food. *J Basic Microbiol.*, **39,** 189-195 (1999).
26. Schlech, W. F. 3rd: Food-borne listeriosis. *Clin. Infect. Dis*., 31, 770-775 (2000).
27. Senthilkumar, A, S. Kumar, and J. N. Sheagren: Increased Incidence of *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Hospitalized Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin. Infect. Dis*., **33**, 1412-1416 (2001).
28. Shornikova, A. V., I. A. Casas, H. Mykkanen, E. Salo, and T. Vesikari: Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis. J*., **16**, 1103-1107 (1997).
29. Still, J., E. Law, B. Friedman, S. Fuhrman, and T. Newton: Vancomycin-resistant organisms on a burn unit. *South Med. J*., **94**, 810-812 (2001).
30. Talarico, T. L., and W. J. Dobrogosz: Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother*., **33**, 674-679 (1989).
31. Tolshihide K., Tadao S., Yasushi K., Junko U. and Takatoshi I.: Production, purification and characterization of reuterin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by Lactobacillus reuteri LA6. *Int. J. Food Microbiol*., **34**, 145-156 (1997).
32. Vignolo G, Fadda S., et al.: Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by 'Lactocin 705', a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* (RL 705). *Int. J. Food Microbiol*., **29**, 397-402 (1996).